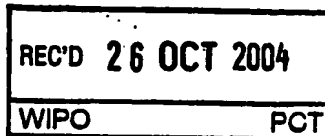


BEST AVAILABLE COPY

PCT/CN2004/000863

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本



申 请 日： 2003. 07. 25

申 请 号： 03146157. 3

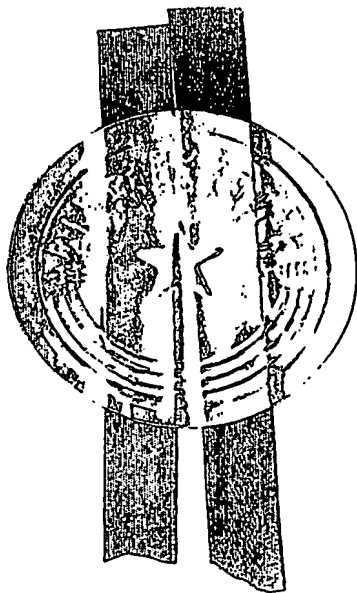
申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 具有抗流感病毒的含C p G 单链脱氧寡核苷酸

申 请 人： 长春华普生物技术有限公司

发明人或设计人： 王丽颖、包木胜、于永利

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2004 年 8 月 20 日

具有抗流感病毒的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

- 1、人工合成的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成。
- 2、按照权利要求 1 所述的单链脱氧核苷酸，它们的磷酸二酯键可以是非硫化的，部分硫化的，也可以是完全硫化的。
- 3、按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们具有 SEQ ID NO: 1-5 任一所示的序列。
- 4、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于诱生细胞产生抗流感病毒物质的用途。
- 5、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病。
- 6、用人工合成的含 CpG 单链脱氧核苷酸治疗和预防由流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病的技术方法和设想。

权 利 要 求 书

- 1、人工合成的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成。
- 2、按照权利要求 1 所述的单链脱氧核苷酸，它们的磷酸二酯键可以是非硫化的，部分硫化的，也可以是完全硫化的。
- 3、按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸，它们具有 SEQ ID NO: 1-5 任一所示的序列。
- 4、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于诱生细胞产生抗流感病毒物质的用途。
- 5、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧核苷酸用于流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病。
- 6、用人工合成的含 CpG 单链脱氧核苷酸治疗和预防由流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病的技术方法和设想。

具有抗流感病毒的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

技术领域:

本发明涉及系列的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸,特别是涉及对流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病有治疗和预防作用的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸,以及用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由流感病毒引起的人流感等呼吸道感染技术方法和技术设想。

背景技术

流感病毒是引起人流感的病原体。在 1918-1919 年,全世界有两千万人死于流感病毒的流行(Patterson, K. D. & Pyle, G. F. (1991) Bull. Hist. Med. 65, 4-213)。流感病毒如此猛烈和难于控制与其本身下述特点密切相关:

- (1) 在空气传播;
- (2) 不断变化抗原性(antigenic drift)逃逸已形成的保护性免疫(Parvin, J. D., Moscona, A., (1986) J. Virol. 59, 377-383; Webster, R. G., (1982) Nature 296, 115-121)
- (3) 通过不同株流感病毒 RNA 可在同一感染细胞内交互重组周期性产生新的突变体(Webster, R. G., (1992) Microbiol. Rev. 56, 152-179)。

接种疫苗和应用抗病毒药物是防治流感病毒的两类主要方法(Bridges, C. B., Fukuda, K., Cox, N. J. & Singleton, J. A. (2001) Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 50, 1-44),但事实证明,这两类方法均不能有效地控制流感的流行(Webster, R. J. & Webster, R. G. (2001) Philos. Trans. R. Soc. London 356, 1817-1828)。在易感人群,接种疫苗的短期(半年)保护率约为 39%(Fukuda, K., N. J. (1999) Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 48, 1-28, Castle, S. C. (2000) Clin. Infect. Dis. 31, 578-585)。由于流感病毒抗原[血细胞凝集素(HA)和神经酰胺酶(NA)]性不断变化,现行的疫苗几乎每年都要重新改构。由于副作用较大和新的抗药流感病毒株不断出现,一些获准抗流感病毒药物的效果也不理想(Luscher-Mattli, M. (2000) Arch. Virol. 145, 2233-2248)。

近年来的研究表明,多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对人的免疫系统均为危险的信号,可激活多种免疫细胞启动机体的抗病毒机制。CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸,C 代表胞嘧啶,G 代表鸟嘌呤,p 代表磷酸。进一步的研究表明,含 CpG 的人工合成的脱氧核糖核酸寡核苷酸(CpG ODN)也可激活多种免疫细胞启动机体的抗病毒机制。

在小鼠和豚鼠阴道应用 CpG ODN 可提高小鼠抵御致死量 HSV-2 病毒攻击的能力(Richard B. Pyles et al. Journal of Virology, November 2002, Vol.76, No. 22 p. 11387-11396)。给小鼠应用 CpG ODN 可减少其呼吸道合胞病毒(RSV)的荷量(Cho JY, et al. J Allergy Clin Immunol 2001 Nov;108(5):697-702)。给感染弗兰德病毒(一种鼠类白血病病毒)的小鼠应用 CpG ODN 可明显减低小鼠血中的病毒载量(Anke R. M. Olbrich, et al. Journal of Virology, November 2002, Vol. 76, No. 22 p. 11397-11404)。给正常 C57BL/6 小鼠于病毒攻击前 2 天静脉注射 CpG ODN,然后用正常致死量的单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)静脉攻击,结果发现 CpG ODN 可使小鼠阴道分泌物中病毒滴度明显降低并刺激生殖道粘膜快速产生的 IFN- γ 、IL-12 和 IL-18 等保护性细胞因子(Harandi AM, et al. J Virol 2003;77(2):953)。



发明内容

发明概述

本发明的目的之一是提供系列人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸特别是对可刺激人外周血细胞产生抗流感病毒的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。优选地，本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 具有 SEQ ID NO: 1-5 所示的序列。

本发明的目的之二是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗流感病毒作用。

本发明的目的之三是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸对流感病毒毒感染引起的流感等人呼吸道的传染性疾病的治疗和预防的作用。

本发明的目的之四是提供用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由流感病毒感染引起的流感等人呼吸道的传染性疾病的的技术方法和设想。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

具体实施方式

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

DVAX-1 : 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg -3'

DVAX-3 : 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTggggg -3'

DVAX-4 : 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3'

DVAX-5 : 5'-TCggggACgATCgTCggggggg-3'

DVAX-6 : 5'-ggATCgATCgATCgATggggggg-3'

其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的CpG单链脱氧核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地列举了一种生产本发明的人工合成的含CpG单链脱氧寡核苷酸的方法。

在预防和治疗由SARS病毒感染引起的人流感等呼吸道的传染性疾病时，这些人工合成的含CpG单链脱氧寡核苷酸的一次用药剂量为1-5000微克。

本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括单独应用、两种或两种以上联合应用、与治疗或预防流感病毒引发的感染性疾病的药物或疫苗混合使用、与治疗 and 预防由流感病毒感染病毒引起的感染性疾病的药物或疫苗通过交联剂共价偶联使用。

应用方式包括粘膜（包括呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜）表面应用，滴眼，皮下、肌肉注射应用，胃肠应用，腹腔应用，静脉注射等常用的方式应用。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，并参照附图进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如合成采用固相亚磷酸胺三酯法。在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不再赘述上述内容。

实施例 1 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的制备

采用固相亚磷酸胺三酯法合成人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。

1、试剂和材料：

三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)、可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)、DMT(二甲氧基三苯甲基)、四氢唑活化剂、乙酸酐、N-甲基咪唑、A、T、C、G 四种核苷酸单体、ABI DNA 合成仪、高效液相色谱层析仪等

2、方法：

脱保护基

用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT)，获得游离的 5'-羟基端，以供下一步缩合反应。

活化

将亚磷酸胺保护的核苷酸单体与四氢唑活化剂混合并进入合成柱，形成亚磷酸胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化，但 5'-端仍受 DMT 保护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

连接

亚磷酸胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

封闭

缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷酸酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸酯转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。

经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基(一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用膦乙基保护)、纯化(常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC 等方法)、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的 CpG 单链脱氧寡核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成；全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法，在 ABI 394 DNA 合成仪上合成。

实施例 2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗流感病毒作用

1、人外周血单个核细胞的分离

仪器设备和器材:

低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

试剂和材料:

肝素抗凝的人全血: 来自两个正常献血员。
长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺:

比重 1.077 ± 0.001 , 北京鼎国生物技术有限公司。

IMDM 培养液:

1000 ml 含庆大霉素 10 万单位。0.22 微米的滤膜抽滤除菌、分装。

方法:

用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心 ($1,000 \times g$, 20min)。用吸管吸取含单个核细胞的液带, 置入另离心管中。加入等体积的无血清培养基。1,000 g 离心 15min, 弃上清。重复洗涤两次。弃上清, 用 2ml 培养基重悬细胞。计细胞数。

2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗流感病毒作用的测定

用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个/毫升。加此细胞悬液于 12 孔培养板, 每孔 2 ml。加入人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 ($6.25 \mu\text{g/ml}$)。

设 DVAX-1 对照: 加入人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 ($5'$ -TgCTTgggTggCAgCTgCCAgggggg- $3'$);

培养液对照: 不加入人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。37℃, 5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时, 收集上清, 检测其抗流感病毒的活性。

用 5% 胎牛血清 IMDM 调节生长状态良好的 Vero 细胞 (ATCC) 浓度至 3×10^5 个/ml。将细胞接种于 96 孔平底培养板, 每孔 100 μl 。将含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 CpG 刺激上清用 5% 胎牛血清 IMDM 稀释 10 倍后, 加样, 每孔加入 100 μl (此时, 每孔体积 200 μl , 即 100 μl 细胞悬液 + 100 μl 稀释后的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 CpG 刺激人上清上清或对照上清)。设干扰素对照, 流感病毒对照和正常 Vero 细胞对照。37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 24 小时。吸弃上清, 每孔加入 2% FBS IMDM 稀释的流感病毒液 (长春生物制品研究所) 200 μl , 继续培养 48-72 小时。待病毒对照孔细胞 80-100% 发生病变, 而细胞对照孔细胞状态良好时, 终止培养, 用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5% 结晶紫染液, 37℃, 15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。0.5% 结晶紫染液: 结晶紫 0.5 克, NaCl 0.85 克, 溶于 50 毫升无水乙醚。加 3 毫升甲醛, 47 毫升蒸馏水。照相记录结果。按图-1 所示加样, 结晶紫染色后的结果见图 2。

图-1、96 孔板加样表

	1	2	3	4	5	6
A	培养液对照	IFN(10IU/ml)	IFN(100IU/ml)	IFN(1000IU/ml)	流感病毒	正常 Vero 细胞
B	正常 Vero 细胞	IFN(10IU/ml)	IFN(100IU/ml)	IFN(1000IU/ml)	正常 Vero 细胞	正常 Vero 细胞
C				DVAX-6 1:20 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:20 稀释 6.25 μg/ml	
D				DVAX-6 1:100 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:100 稀释 6.25 μg/ml	
E				DVAX-6 1:500 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:500 稀释 6.25 μg/ml	
F	DVAX-3 1:20 稀释 6.25 μg/ml			DVAX-4 1:20 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-5 1:20 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:20 稀释 6.25 μg/ml
G	DVAX-3 1:100 稀释 6.25 μg/ml			DVAX-4 1:100 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-5 1:100 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:100 稀释 6.25 μg/ml
H	DVAX-3 1:500 稀释 6.25 μg/ml			DVAX-4 1:500 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-5 1:500 稀释 6.25 μg/ml	DVAX-6 1:500 稀释 6.25 μg/ml

注释: DVAX-1 对照: 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸, 其序列为: 5'- TgCTTgggTggCAGCTgCCAgggggg -3'

培养液对照: 未加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清

正常 Vero 细胞: 未加流感病毒

流感病毒: 来加细胞培养上清, 加流感病毒

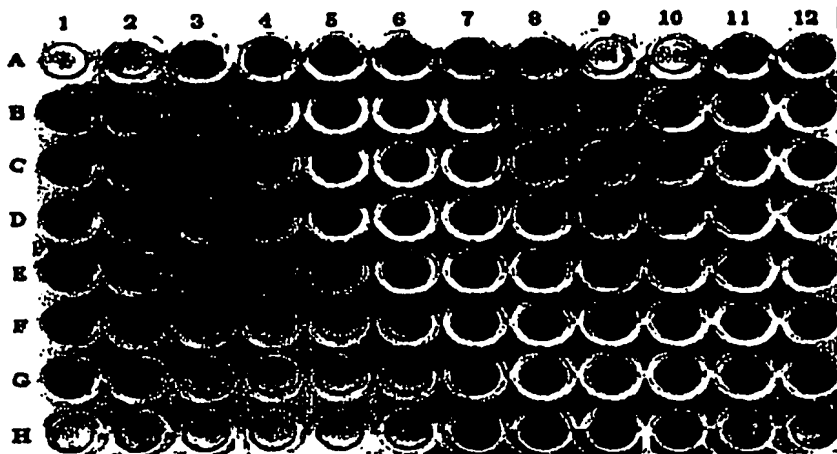
DVAX1, 3, 4, 5, 6 分别代表加代号为 DVAX1, 3, 4, 5, 62, 3 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

IFN: 干扰素 α , 长春生物制品研究所

C, D, E 1-10; F, GH3-4: 为一献血员的外周血单个核细胞诱导上清。

C, D, E 11-12; F, G, H 5-12: 为另一献血员的外周血单个核细胞诱导上清。

图-2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸刺激人外周血单个核细胞培养上清对流感病毒攻击 Vero 细胞的保护作用



结果表明,人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 DVAX-1, DVAX-3, DVAX-4, DVAX-5 和 DVAX-6 (SEQ ID NO: 1-5) 具有刺激人外周血单个核细胞产生抗流感病毒物质的作用,这些物质对流感病毒攻击 Vero 细胞具有明确的保护作用;人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 DVAX-1, DVAX-3, DVAX-4, DVAX-5 和 DVAX-6 (SEQ ID NO: 1-5) 对流感病毒毒感染引起的流感等人呼吸道的传染性疾病的治疗和预防的作用。

SEQUENCE LISTING

<110> 长春华普生物技术有限公司

<120> 具有抗流感病毒的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

<160> 6

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 1

TcgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg

26

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 2

TCgTCgTTTCgTCgTTgggg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 3

TCgTCgTTTCgTCgTTgggg

20



<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> artigicial
<220>
<221>
<222>
<223>
<400> 4

TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC

23

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> artigicial
<220>
<221>
<222>
<223>
<400> 4

TCggggACgATCgTCggggggg

21

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> artigicial
<220>
<221>
<222>
<223>
<400> 6

ggATCgATCgATCgATggggggg

22

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.